

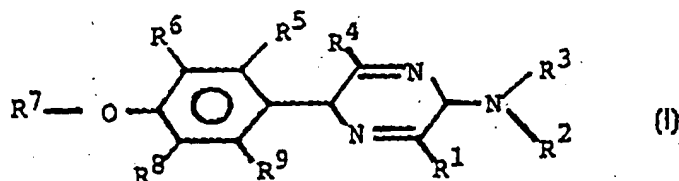


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 31/495	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/43641 (43) Date de publication internationale: 8 octobre 1998 (08.10.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE98/00044 (22) Date de dépôt international: 30 mars 1998 (30.03.98) (30) Données relatives à la priorité: 9700294 28 mars 1997 (28.03.97) BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN [BE/BE]; Halles Universitaires, Place de l'Université 1, B-1348 Louvain-la-Neuve (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): REES, Jean-François [BE/BE]; Rue des Tilleuls 29, B-1435 Hevillers (BE). DUBUISSON, Marlène [BE/BE]; Rue Joseph Lepage 21, B-4250 Geer (BE). TROUET, André [BE/BE]; Predikherenberg 20, B-3020 Herent (BE). (74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1083 Bruxelles (BE).	(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale.	

(54) Title: PHARMACEUTICAL, COSMETIC AND/OR FOOD COMPOSITION WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES

(54) Titre: COMPOSITION PHARMACEUTIQUE, COSMETIQUE ET/OU ALIMENTAIRE AUX PROPRIÉTÉS ANTI-OXYDANTES



(57) Abstract

The invention concerns a pharmaceutical, cosmetic and/or food composition comprising a pyrazine derivative of formula (I) characterised in that the radicals R^1 to R^9 are H, radicals selected among the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl aryl, arylalkyl, alkylaryl, heteroaryl, heteroalkyl, and hetero-(alkylaryl and arylalkyl), optionally substituted, or chains of formula $(R^5 \times R^6)_n$, in which $n \geq 1$, x represents one or several heteroatoms and R^5 and R^6 are radicals selected among the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, arylalkyl, alkylaryl, heteroaryl, heteroalkyl, and hetero-(alkylaryl and arylalkyl), optionally substituted. The invention also concerns the use of such a composition for preparing a medicine for preventing and/or treating pathologies related to the activity of oxygen promoters or for treating cancer tumours.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire comprenant un dérivé de pyrazine de formule (I) caractérisée en ce que les radicaux R^1 à R^9 sont H, des radicaux choisis parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, alkylaryle, hétéroaryle, hétéroalkyle et hétéro-(alkylaryle et arylalkyle), éventuellement substitués, ou des chaînes de formule $(R^5 \times R^6)_n$, où $n \geq 1$, x représente un ou plusieurs hétéro-atomes et R^5 et R^6 sont des radicaux choisis parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, alkylaryle, hétéroaryle, hétéroalkyle et hétéro-(alkylaryle et arylalkyle), éventuellement substitués. La présente invention concerne également l'utilisation d'une telle composition pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des pathologies liées à l'action des agents pro-oxydants ou au traitement des tumeurs cancéreuses.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

5

10 COMPOSITION PHARMACEUTIQUE, COSMETIQUE ET/OU ALIMENTAIRE
AUX PROPRIETES ANTI-OXYDANTES

Objet de l'invention

La présente invention concerne une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire destinée en particulier à la prévention et/ou le traitement de pathologies liées aux agents pro-oxydants.

La présente invention concerne également l'utilisation de la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire selon l'invention.

20

Arrière-plan technologique et état de la technique

La demande de brevet W096/28160 décrit une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire ayant des propriétés anti-oxydantes, et comprenant un dérivé de pyrazine ou un précurseur de celle-ci, les dérivées étant des imidazolopyrazines telles que la coelentérazine.

Ce document décrit également l'utilisation d'une telle composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire pour le traitement de pathologies liées à l'action des agents pro-oxydants telles que les pathologies inflammatoires, ou l'application de ladite composition pour

le traitement de tumeurs cancéreuses.

Des molécules antioxydantes telles que des vitamines comme la vitamine E (soluble dans des lipides) ou des dérivés de cystéine (soluble dans l'eau) sont également
5 déjà utilisés dans des applications cosmétiques, pharmaceutiques et/ou alimentaires. Cependant, de telles molécules antioxydantes sont caractérisées soit par une faible solubilité dans l'eau, soit par une toxicité élevée, par une efficacité trop faible ou par une faible stabilité
10 vis-à-vis de d'oxygène.

Buts de l'invention

La présente invention vise à obtenir une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire
15 permettant la fixation d'agents pro-oxydants qui ne présenterait pas les inconvénients de l'état de la technique.

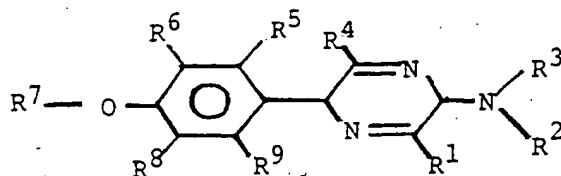
Un but particulier de la présente invention vise à obtenir une composition pharmaceutique, cosmétique
20 et/ou alimentaire permettant avantageusement la prévention et/ou le traitement de pathologies liées aux agents pro-oxydants.

Un autre but de la présente invention vise à fournir une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou
25 alimentaire qui soit caractérisée par une stabilité améliorée par rapport aux produits de l'état de la technique, par une faible toxicité ou une absence de toxicité, par une importante solubilité dans un grand nombre de solvants et/ou des lipides.

Eléments caractéristiques de la présente invention


La présente invention concerne une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire comprenant un dérivé de pyrazine de formule

5



- 10 dans lequel les radicaux R^1 à R^9 sont H, des radicaux choisis parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, alkylaryle, hétéroaryle, hétéroalkyle et hétéro-(alkylaryle et arylalkyle), de
- 15 préférence constitués de 1 à 20 atomes de carbone comprenant éventuellement 1 à 10 hétéroatomes et dont les atomes de carbone peuvent être éventuellement substitués par un quelconque élément du tableau de Mendeleev, de préférence un élément choisi parmi le groupe constitué par H, B, N, O, F, P, S, Cl, As, Se, Br, Te et I, ou des
- 20 chaînes de formule $(R^5 \times R^6)_n$, où $n \geq 1$, x représente un ou plusieurs hétéro-atomes et R^5 et R^6 sont des radicaux choisis parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, alkylaryle, hétéroaryle, hétéroalkyle et hétéro-(alkylaryle et arylalkyle),
- 25 constitués de 1 à 20 atomes de carbone comprenant éventuellement 1 à 10 hétéroatomes et dont les atomes de carbone peuvent être éventuellement substitués par un quelconque élément du tableau de Mendeleev, de préférence un élément choisi parmi le groupe constitué par H, B, N, O,
- 30 F, P, S, Cl, As, Se, Br, Te et I; et éventuellement un véhicule pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire

adéquat.

De préférence, dans le dérivé de pyrazine selon l'invention, les radicaux R^2 à R^9 sont H et le radical R^1 est un radical de formule CH_3 - et éventuellement un véhicule pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire adéquat.

Un autre aspect de la présente invention concerne l'utilisation de la composition selon l'invention pour la fixation d'agents pro-oxydants (formes activées de l'oxygène) tels que peroxydes, superoxydés, ...

La présente invention concerne également un procédé de fixation d'agents pro-oxydants dans lequel on met en contact la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire avec lesdits agents pro-oxydants.

La présente invention concerne également un procédé de traitement et/ou de prévention de pathologies liées à l'action d'agents pro-oxydants, en particulier des pathologies inflammatoires, ainsi qu'un procédé de traitement et/ou de prévention de l'athérosclérose, dans lesquels on administre à un patient (homme ou animal) la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire selon la présente invention.

Dans lesdits procédés, la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire est associée à un effet thérapeutique. Cependant, ladite composition peut aussi être caractérisée comme étant une composition alimentaire "fonctionnelle".

Une "composition alimentaire fonctionnelle" est caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs ingrédients susceptibles d'avoir un effet physiologique bénéfique sur le consommateur, tel que la prévention d'une

maladie, le traitement d'une maladie, l'activation du biorythme ou du système immunitaire. Une telle composition alimentaire fonctionnelle peut être englobée dans la diète normale du consommateur, de manière à procurer une
5 amélioration générale de la santé du patient ou pour obtenir le traitement ou la prévention d'une maladie particulière, pour autant que ladite composition alimentaire fonctionnelle ait un effet significatif tant du point de vue préventif que thérapeutique sur le
10 consommateur.

Ladite composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire comprendra une quantité suffisante du dérivé de pyrazine selon l'invention de manière à obtenir une prévention ou un effet thérapeutique significatif sur
15 le consommateur.

La proportion du dérivé de pyrazine selon l'invention dans la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire selon l'invention variera en fonction des quantités journalières de produit absorbé, suivant la
20 législation alimentaire, cosmétique et pharmaceutique adéquate, les appréciations organoleptiques et les effets secondaires susceptibles d'exister avec les dérivés selon l'invention et/ou leurs véhicules pharmaceutiques, cosmétique et/ou alimentaires utilisés.

25 Les véhicules pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires des compositions selon l'invention sont des véhicules adéquats notamment pour l'administration orale, par exemple sous forme de tablettes, enrobées ou non enrobées, de pilules, de capsules, de solutions, d'huiles
30 essentielles et/ou de sirops.

D'autres véhicules pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires adéquats peuvent être

utilisés selon le mode d'administration choisi.

En particulier, ces véhicules pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires peuvent être des crèmes ou des huiles solaires bien connues de l'Homme du Métier, qui peuvent enduire différentes parties du corps humain ou animal en combinaison avec d'autres agents protecteurs de la peau.

En outre, les produits de l'invention peuvent être aisément incorporés dans des solvants (milieux aqueux, alcools, ...) ou des lipides (par exemple en combinaison avec des huiles alimentaires ou des huiles de bronzage).

Les compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires selon l'invention sont préparées selon des procédés généralement utilisés par l'Homme du Métier, en particulier par les pharmaciens, et peuvent comprendre tout véhicule ou tout adjuvant pharmaceutiquement adéquat, solide ou liquide, et non toxique.

L'incorporation des dérivés selon l'invention dans un milieu galénique peut également être envisagée.

Le pourcentage de produit actif (dérivés de pyrazine) dans le véhicule pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire peut varier selon de très larges gammes, généralement limitées par la tolérance et le niveau d'acceptation de la composition par le consommateur.

Les limites sont généralement déterminées par la fréquence de consommation de la composition par le consommateur.

Un dernier aspect de la présente invention concerne l'utilisation de la composition selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des pathologies liées à l'action d'agents pro-oxydants.

En particulier, la présente invention concerne l'utilisation de la composition selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des pathologies inflammatoires ou cancérigènes, à la prévention de l'athérosclérose et/ou au traitement des tumeurs cancéreuses.

Brève description des figures

10 La figure 1 représente le pourcentage de survie cellulaire d'hépatocytes de rats en fonction de doses croissantes (Molaires) de coéluentéramine.

15 La figure 2 représente l'oxydation de "low-density lipoproteins" (LDL) avec un initiateur radicalaire hydrosoluble (AAPH) en présence de coéluentéramine.

La figure 3 représente le suivi de l'oxydation de "low-density lipoproteins" humaines par du Cu^{2+} en fonction du temps.

20 La figure 4 illustre le pourcentage de survie d'hépatocytes soumis à l'action de la nitrofurantoïne.

25 La figure 5 illustre l'accroissement de la résistance de fibroblastes soumis à l'action d'un stress oxydatif (concentration croissante en t-BHP) en présence ou en l'absence de coéluentéramine.

30 La figure 6 illustre la réduction de la libération de lactate-déshydrogénase par des hépatocytes de rats lorsque des doses croissantes de coéluentéramine sont additionnées au milieu de culture.

Exemples

La coéluentéramine (CLM) est un produit naturel présent chez les organismes marins, et qui dérive de l'oxydation de la coéluentérazine.

- 5 La structure du la coéluentéramine est illustrée ci-dessous. Cette structure présente les caractéristiques suivantes :

Exemple 1 : stabilité

- 10 La coéluentéramine est caractérisée par une excellente stabilité vis-à-vis de l'oxygène, aussi bien sous forme de poudre qu'après solubilisation dans des solvants aqueux et organiques. En effet, cette molécule n'est pas altérée par un séjour de plusieurs jours en
15 solvant aqueux exposé à l'air. Après plusieurs jours, aucun produit de dégradation de la coéluentéramine n'a été identifié après analyse chromatographique en HPLC et TLC.

Exemple 2 : toxicité

- 20 La coéluentéramine est caractérisée par une absence de toxicité tant sur les cellules hépatiques que sur les cellules intestinales ou les fibroblastes. La coéluentéramine a été appliquée sur des cultures primaires d'hépatocytes de rats ensemencées en microplaques (20000
25 cellules par puits, 200 μ l). Les doses en CLM allaient de $1.3 \cdot 10^{-5}$ à $5 \cdot 10^{-4}$ M. Après une période de 24 heures, leur survie a été évaluée par une mesure des contenus en protéines totales dans chaque puits (méthode de Bradford). Les résultats, représentés dans la figure 1, exprimés en
30 pourcentage de la survie des contrôles non traités par la CLM, démontrent que cette dernière n'est pas du tout toxique pour les hépatocytes à ces concentrations. Des

résultats similaires ont été obtenus sur des fibroblastes humains (MRC-5) ainsi que des cellules intestinales humaines (CAC02).

5 Exemple 3 : activité protectrice des lipoprotéines

L'athérosclérose constitue une cause majeure de mortalité cardio-vasculaire. Des études épidémiologiques ont permis de montrer qu'un développement accéléré de l'athérosclérose est associé à un taux plasmatique élevé en
10 "low-density lipoproteins" (LDL). Il est connu que les LDL contiennent différents agents anti-oxydants, dont l'élément majeur est l' α -tocophérol (vitamine E). L'acide ascorbique (vitamine C), l'ubiquinone et le β -carotène représentent les autres principales molécules anti-oxydantes des LDL. Il
15 a été mis en évidence in vitro que la transformation des macrophages en cellules spumeuses chargées en lipides (qui sont les principaux constituants de la plaque d'athérosclérose) est liée à une modification de nature oxydative des LDL. L'oxydation des LDL est un processus
20 médié par des radicaux libres et initié par la peroxydation des acides gras polyinsaturés après consommation des agents anti-oxydants. L'oxydation des LDL augmente fortement les propriétés athérogènes. Des études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre la mortalité cardio-
25 vasculaire et la concentration plasmatique en anti-oxydants (tels que la vitamine E). Par conséquent, les anti-oxydants hydro- et liposolubles peuvent protéger les LDL et retarder ou empêcher leur processus d'oxydation. Dès lors, afin d'estimer l'effet protecteur de la coéluentéramine contre
30 l'athérosclérose, on compare l'oxydation in vitro des LDL en l'absence ou en présence de concentrations variables en coéluentéramine.

L'oxydation des acides gras polyinsaturés des LDL s'accompagne de la formation de diènes conjugués qui présentent une absorbance maximale à 234 nm. Ces diènes conjugués résultent du réarrangement des doubles liaisons d'acides gras polyinsaturés suite à l'abstraction d'un hydrogène malonique. L'augmentation de l'absorption des diènes conjugués peut être directement mesurée en solution sans avoir recours à l'extraction des lipides. On observe successivement une phase de latence pendant laquelle peu de diènes sont produits, une phase de propagation durant laquelle l'absorbance à 234 nm augmente rapidement pour atteindre un plateau et une phase de décomposition où les aldéhydes formés absorbent aussi dans la région de 210-240 nm, produisant ainsi une nouvelle augmentation de l'absorbance à 234 nm. La mesure des diènes conjugués apparaît actuellement comme le meilleur indicateur de l'oxydabilité des LDL lorsque l'on dispose de préparations pures de LDL (Esterbauer et al. (1989)).

En milieu acellulaire, l'oxydation des LDL peut être catalysée par des ions métalliques tels que le cuivre ou déclenchée par un initiateur radicalaire hydrosoluble tel que le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH).

Pour la mesure des diènes conjugués, une solution de LDL (concentration finale de 50 µg protéine / ml de tampon PBS, pH 7,4) est incubée en présence de 5 µM de cuivre ou de 2 µM d'AAPH et en absence ou en présence de concentrations variables en CLM dans une cuvette en quartz ayant un chemin optique de 1 cm. On mesure en fonction du temps, les absorbances à 234 nm des différents échantillons sur un spectrophotomètre UV-visible (DU-8, Beckman). Un blanc est obtenu au moyen d'une solution phosphate sans LDL

mais contenant 5 μM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 2,5 μM de CLM. Les tests sont réalisés à 30° C pour l'oxydation des LDL en présence de cuivre et à 37 °C en présence d'AAPH.

Les résultats indiquent que la CLM exerce une importante action protectrice des LDL vis-à-vis de leur oxydation par l'AAPH ou le cuivre. L'action de la CLM sur l'oxydation des LDL par l'AAPH est illustrée à la figure 2, dans laquelle on observe le ralentissement important de l'apparition des diènes conjugués avec des concentrations croissantes de CLM. Des résultats similaires sont observés lorsque l'oxydation des LDL est réalisée par le cuivre. La figure 3 illustre le retard dans l'apparition des TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), correspondant essentiellement en malonalaldéhyde (MDA), produit de l'oxydation des lipides contenus dans les LDL.

Exemple 4 : action protectrice vis-à-vis de cellules soumises à un stress oxydatif

Des cultures primaires d'hépatocytes ont été soumises à l'action du tert-butyl-hydroperoxyde (t-BHP) et de la nitrofurantoïne (NF). L'action du t-BHP est liée à son pouvoir oxydant direct tandis que l'action de la NF résulte de la production d'anions superoxydes lors de sa métabolisation par le cytochrome P450 des cellules.

La figure 4 illustre la survie d'hépatocytes soumis à l'action de la NF $3 \cdot 10^{-4}$ M pendant 6 heures. Au terme de ce traitement, la survie (estimée par la méthode MTT) était de 18% chez les groupes contrôles. Lorsque la CLM est additionnée au milieu de culture, la survie des hépatocytes augmente régulièrement pour atteindre 70% des contrôles à $5 \cdot 10^{-5}$ M CLM.

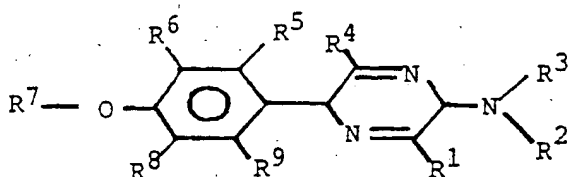
La figure 5 illustre l'accroissement de la résistance de fibroblastes sujets à l'action du t-BHP par la CLM 10^{-5} M. Dans ce cas, on observe un déplacement significatif de la courbe de cytotoxicité (mesurée par test 5 MTT) du t-BHP vers de plus fortes concentrations en présence de CLM.

Des résultats similaires sont observés chez les hépatocytes traités par le t-BHP. La figure 6 illustre la réduction de la libération de lactate déshydrogénase 10 (LDH), indicatrice d'une cytotoxicité, par les cellules lorsque la CLM (10 et 50 μ M) est additionnée au milieu de culture. La mortalité, qui est de 75% chez les contrôles, n'atteint plus que quelques % en présence de CLM 50 μ M.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire comprenant un dérivé de pyrazine de formule

5



caractérisée en ce que les radicaux R^1 à R^9 sont H, des radicaux choisis parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, alkylaryle, hétéroaryle, hétéroalkyle et hétéro-(alkylaryle et arylalkyle), éventuellement substitués, ou des chaînes de formule $(R^5 \times R^6)_n$, où $n \geq 1$, x représente un ou plusieurs hétéro-atomes et R^5 et R^6 sont des radicaux choisis parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, alkylaryle, hétéroaryle, hétéroalkyle et hétéro-(alkylaryle et arylalkyle), éventuellement substitués.

20

2. Composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire selon la revendication 1, caractérisée en ce que les radicaux R^2 à R^9 sont H et que le radical R^1 est un radical de formule $-\text{CH}_3$ -

3. Utilisation de la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire selon la revendication 1 ou 2, pour la fixation d'agents pro-oxydants.

4. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des pathologies liées à l'action des agents

30

pro-oxydants.

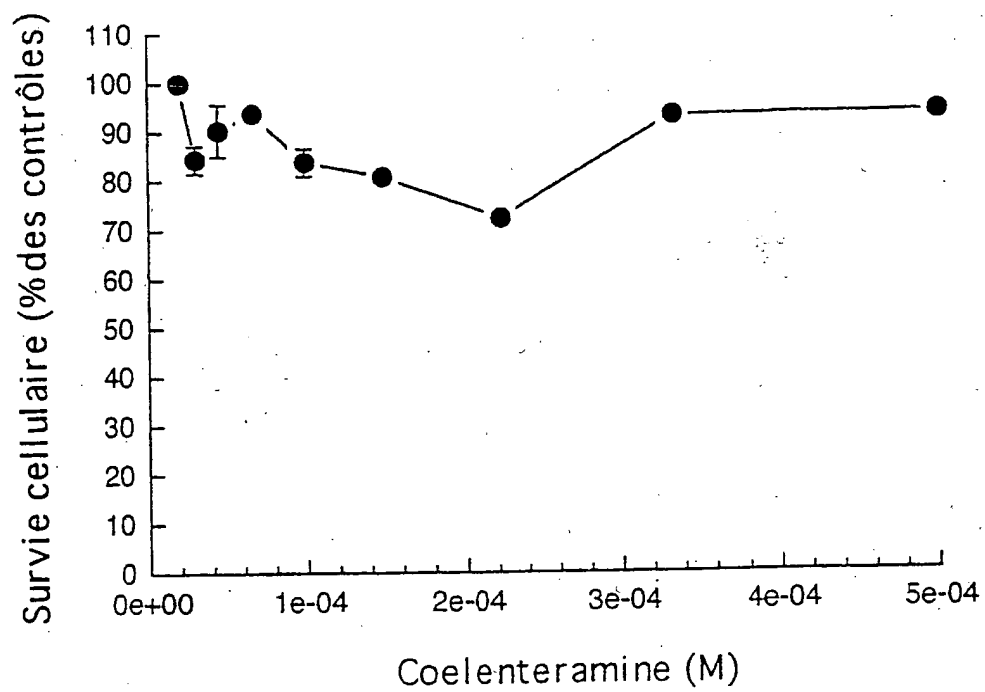
5. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou
5 au traitement des pathologies inflammatoires.

6. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des pathologies cancérigènes.

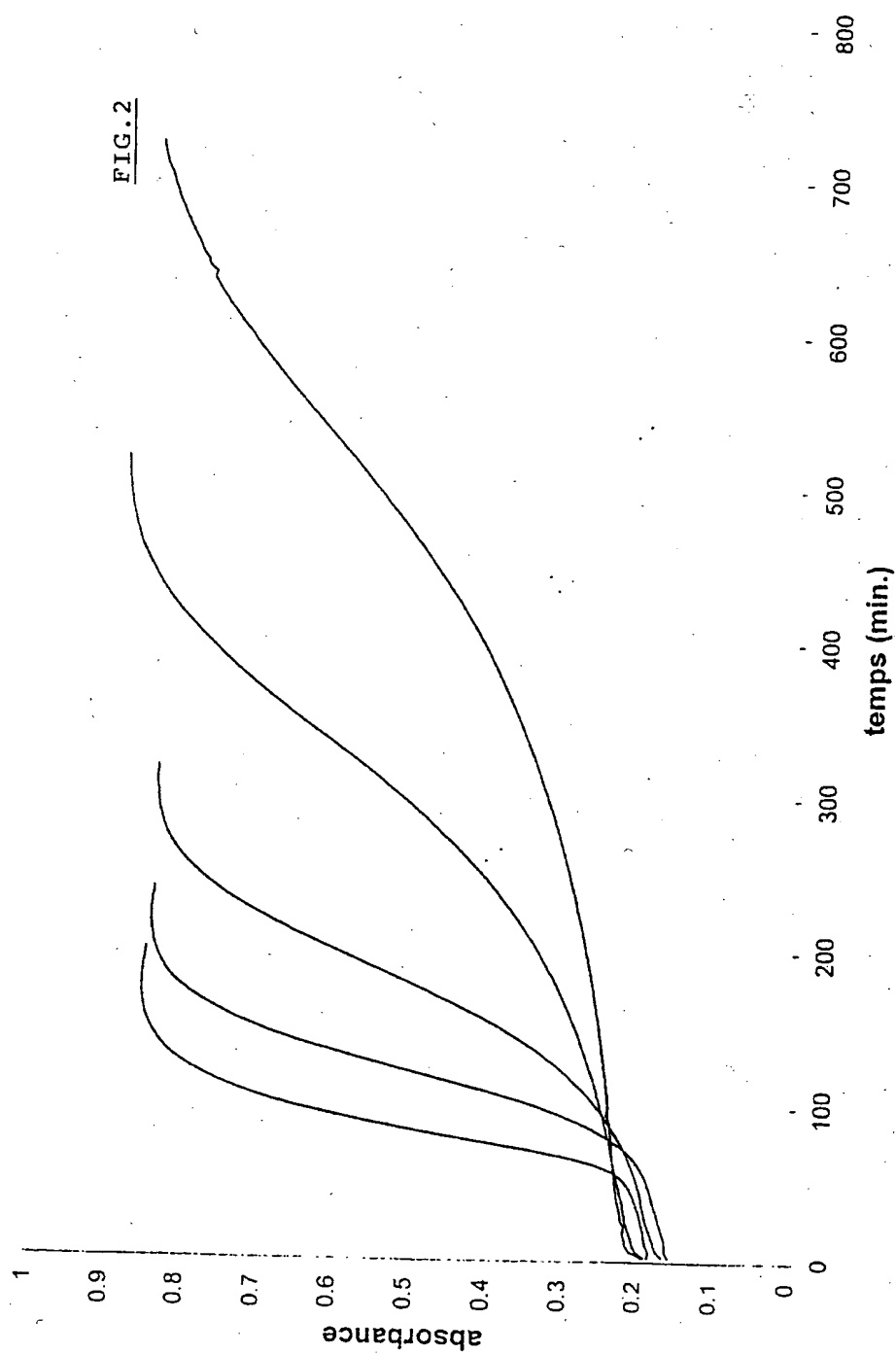
10 7. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement de l'athérosclérose.

15 8. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des tumeurs cancéreuses.

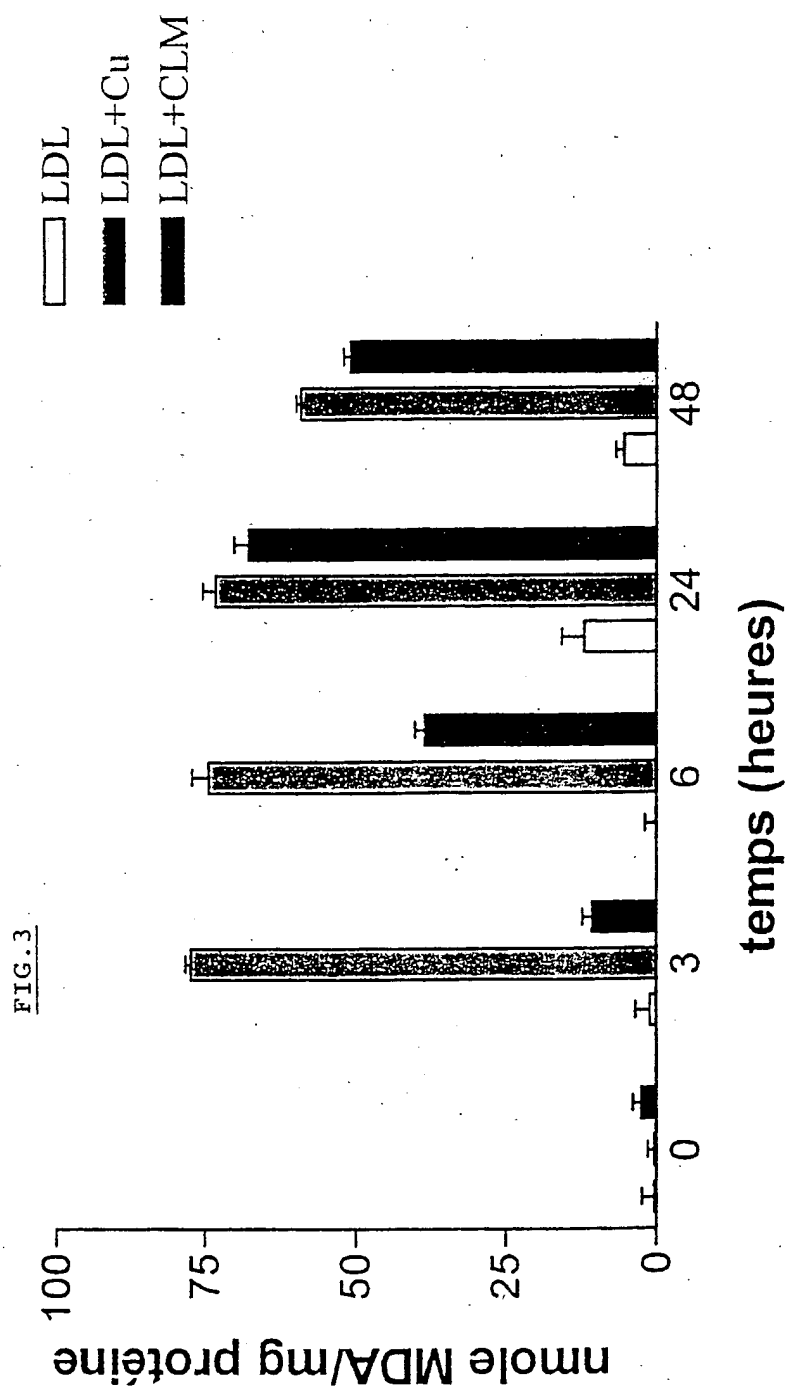
1/5

FIG.1

2/5



3/5



4/5

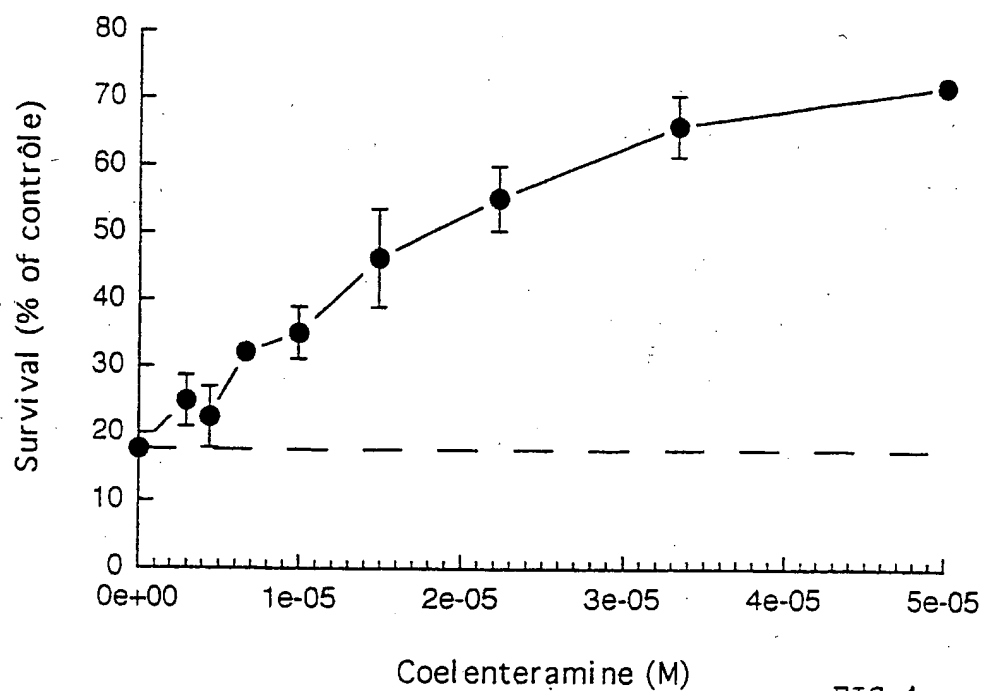


FIG.4

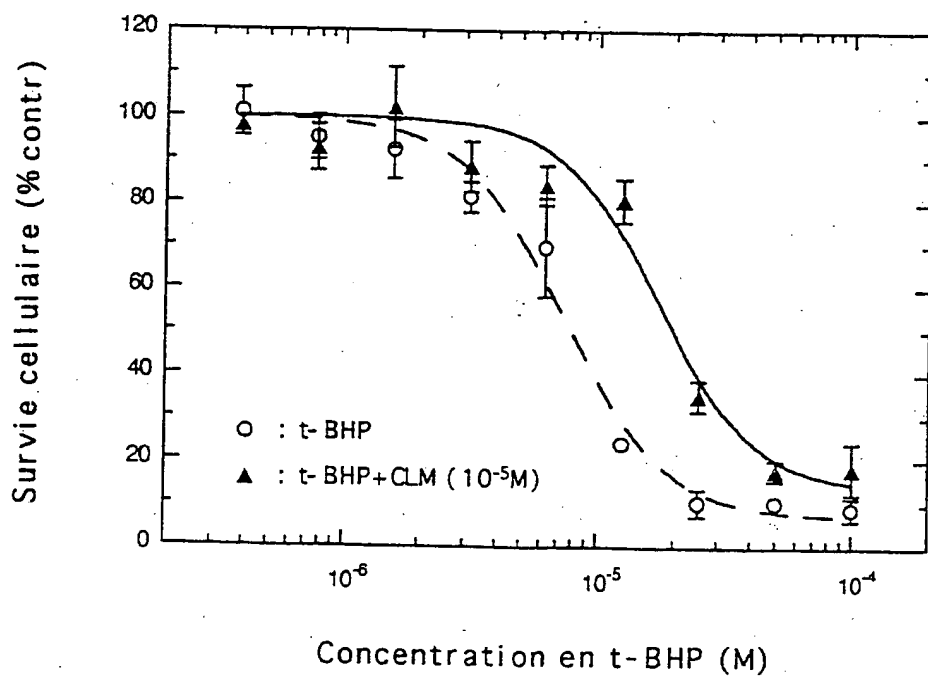
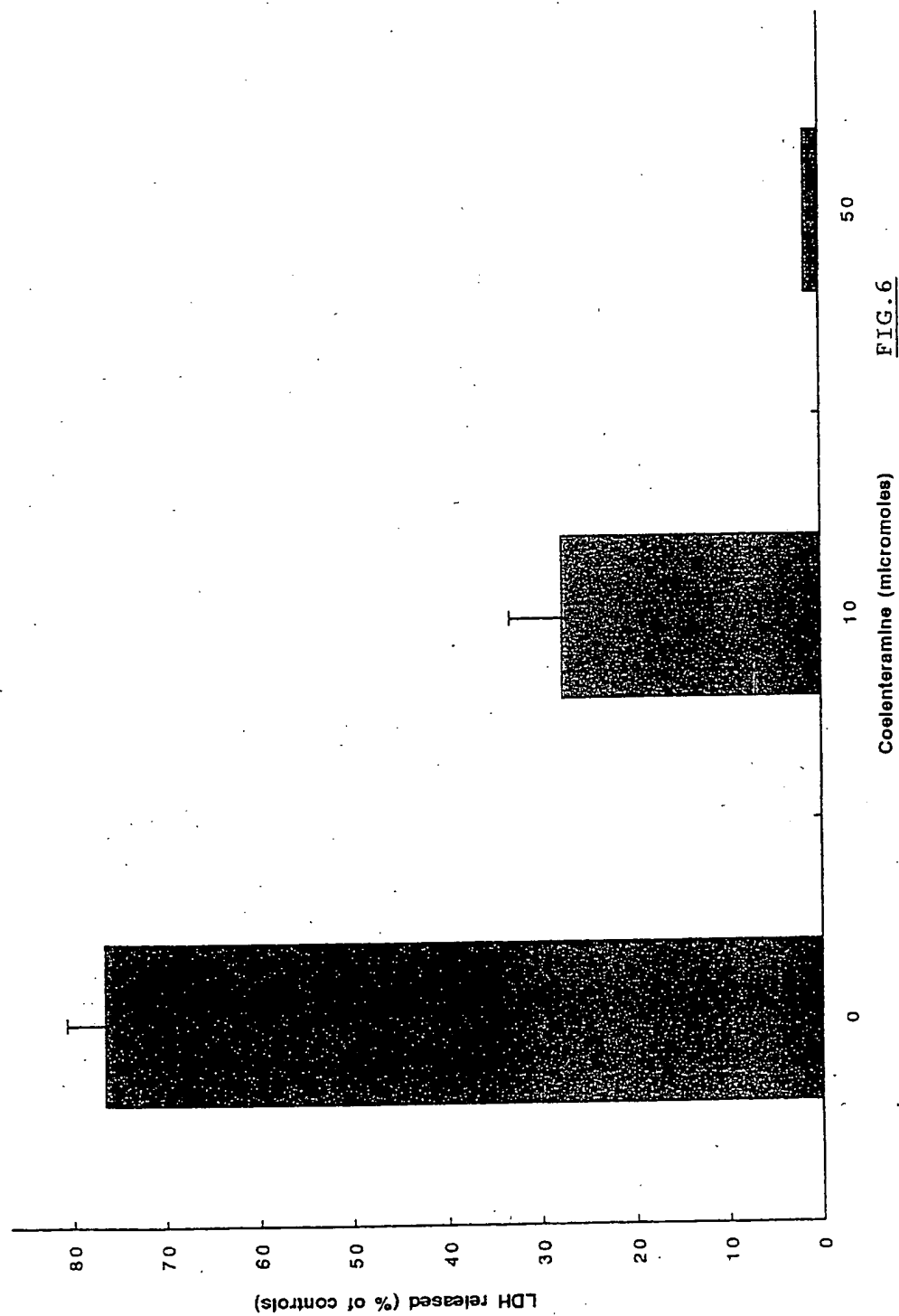


FIG.5

5/5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/BE 98/00044

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/495

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 28160 A (UNIV LOUVAIN ; REES JEAN FRANCOIS (BE)) 19 September 1996 see the whole document	1-8
A	NAKONA M.: "Determination of Superoxide Radical and Singlet Oxygen Based on Chemiluminescence of Luciferin Analogs." METHODS ENZYMOLOGY, vol. 186, 1990, pages 585-592, XP002045627 see the whole document	1-3,5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 July 1998

Date of mailing of the international search report

22.07.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

A. Jakobs

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No
PCT/BE 98/00044

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LUCAS ET AL.: "Coelenterazine Is a Superoxide Anion-Sensitive Chemiluminescent Probe: Its Usefulness in the Assay of Respiratory Burst in Neutrophils"</p> <p>ANAL. BIOCHEM., vol. 206, 1992, pages 273-277, XP002045628 see the whole document</p> <p>---</p>	1-4
A	<p>INOUE ET AL.: "A new synthesis of Watasenia preluciferin by cyclisation of 2-amino-3-benzyl-5-(p-hydroxyphenyl)pyrazine with p-hydroxyphenylpyruvic acid."</p> <p>CHEM. LETT., vol. 3, 1980, P0C038, pages 299-300, XP002045630 see the whole document</p> <p>-----</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BE 98/00044

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplementary sheet CONTINUATION OF INFORMATION PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BE 98/00044

The examples use coelenteramine, which, however, does not correspond to the formula of claim 1 since coelenteramine is a pyrazine and not a dihydropyrazine. Claim contains a pentavalent carbon atom. The search was carried out on the admission that R1 is a radical of formula -CH₂-phenyl.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: al Application No

PCT/BE 98/00044

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9628160 A	19-09-1996	BE 1009196 A	03-12-1996
		CA 2215046 A	19-09-1996
		EP 0814808 A	07-01-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/BE 98/00044

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K31/495

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 28160 A (UNIV LOUVAIN ; REES JEAN FRANCOIS (BE)) 19 septembre 1996 voir le document en entier	1-8
A	NAKONA M.: "Determination of Superoxide Radical and Singlet Oxygen Based on Chemiluminescence of Luciferin Analogs." METHODS ENZYMOLOGY, vol. 186, 1990, pages 585-592, XP002045627 voir le document en entier	1-3,5

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 juillet 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22.07.98

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

A. Jakobs

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/BE 98/00044

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>LUCAS ET AL.: "Coelenterazine Is a Superoxide Anion-Sensitive Chemiluminescent Probe: Its Usefulness in the Assay of Respiratory Burst in Neutrophils"</p> <p>ANAL. BIOCHEM., vol. 206, 1992, pages 273-277, XP002045628 voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-4
A	<p>INOUE ET AL.: "A new synthesis of Watasenia preluferin by cyclisation of 2-amino-3-benzyl-5-(p-hydroxyphenyl)pyrazine with p-hydroxyphenylpyruvic acid."</p> <p>CHEM. LETT., vol. 3, 1980, P0C038, pages 299-300, XP002045630 voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1,2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/BE 98/00044

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No. PCT/BE 98/00044

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Les exemples utilisent la coéclentéramine, celle-ci ne correspond pourtant pas à la formule de la première revendication car la coéclentéramine est une pyrazine et non une dihydropyrazine.

La deuxième revendication comporte un atome de carbone pentavalent. La recherche a été effectuée en admettant que R1 est un radical de formule -CH2-phényle.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/BE 98/00044

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9628160 A	19-09-1996	BE 1009196 A	03-12-1996
		CA 2215046 A	19-09-1996
		EP 0814808 A	07-01-1998

THIS PAGE BLANK (USPTQ)